

緑の2菌種と臨床分離84株の *M. avium* において西森らの MATR-0 によって PCR が可能であったのは *M. avium* subsp. *paratuberculosis*: ATCC 19698 のみであった。クローン病の原因菌である *M. avium* subsp. *paratuberculosis* は核酸の塩基配列を解析する 16S rRNA 法や *rpoB* 遺伝子によって他の *M. avium* (*M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. "*suis*", *M. avium* subsp. *silvaticum*) から分けることができないが⁸⁾、西森らの *M. avium* 用 VNTR・MATR-0 は *M. avium* subsp. *paratuberculosis* をこれらから簡単に分けることが可能であると考えられる。

まとめ

VNTR は、迅速であり、微量で検査可能、多クローン感染と他の菌種の混在を確認でき、RFLP でバンド数の少ない株の確認方法として使えるなど有用性が高い。しかし、VNTR は変化が RFLP より少なく、VNTR では接触のない症例同士が同じパターンとなった例があった。このためわれわれは VNTR を2段階と考え、まず被検株の多クローン感染と他の菌種の複合感染がないことを確認するために VNTR を行い、シングルコロニーを確保した後に再度、解析のために VNTR を行う。そして同じパターンが出たときは RFLP を行い、総合判断することによってより精度の高い分析ができると考えられる。また1症例から異なったパターンが得られる可能性を考え、複数回の臨床材料採取が望ましいと考えられる。

謝 辞

貴重な臨床分離株を分与して頂きました東北大学医学部の芦野有悟先生に深謝致します。

文 献

- 1) BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology, Volume 2. William & Wilkins, U.S.A., 1984, 1448-1449.
- 2) 豊田丈夫, 青柳昭雄, 斎藤 肇, : *M. avium* 症と *M. intracellulare* 症. 結核. 1993; 68: 63-69.
- 3) 斎藤 肇, 村上和保, 石井則久, 他: 「24時間風呂」からの *Mycobacterium avium* complex の検出. 結核. 2000; 75: 19-25.
- 4) 佐藤明正, 穴田勝進, 松尾秀輝, 他: ブタ抗酸菌症をひき起こす *Mycobacterium avium*-*M. intracellulare* の感染源. 結核. 1987; 62: 61-66.
- 5) Van Soelingen D, Bauer J, Ritacco V, et al.: IS1245 restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium avium* isolates: proposal for standardization. J Clin Microbiol. 1998; 36: 3051-3054.
- 6) Guerrero C, Bernasconi C, Burki D, et al.: A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. J Clin Microbiol. 1995; 33: 304-307.
- 7) Supply P, Mazars E, Lesjean S, et al.: Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. Molecular Microbiology. 2000; 36: 762-771.
- 8) 鹿住祐子, 前田伸司, 菅原 勇: *rpoB* 遺伝子と 16S rRNA 解析による抗酸菌同定の試み. 結核. 2006; 81: 551-558.
- 9) 西森 敬, 内田郁夫, 田中 聖, 他: VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) 型別による結核菌群および鳥型結核菌の分子疫学的解析マニュアル. 動衛研研究報告書. 2003; 109: 25-32.
- 10) 高橋光良: 結核と *M. avium* 感染症の分子疫学の新たな展開. 資料と展望. 2004; 51: 57-70.
- 11) Johansen TB, Djonje B, Jensen MR, et al.: Distribution of IS1311 and IS1245 in *Mycobacterium avium* subspecies revisited. Clin Microbiol. 2005; 43: 2500-2502.
- 12) 阿部千代治, 齋藤由美子, 本山禎二, 他: アンプリコアマイコバクテリウムキットの評価に関する共同研究. 結核. 1997; 72: 181-186.
- 13) 伊藤邦彦, 高橋光良, 青山 崇, 他: 病院検査室における結核菌培養の Cross-contamination. 結核. 1999; 74: 777-788.
- 14) Picardeau M, Varnerot A, Lecompte T, et al.: Use of different molecular typing techniques for bacteriological follow-up in a clinical trial with AIDS patients with *Mycobacterium avium* bacteremia. J Clin Microbiol. 1997; 35: 2503-2510.
- 15) Lari N, Cavallini M, Rindi L, et al.: Typing of human *Mycobacterium avium* isolates in Italy by IS1245-based restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol. 1998; 36: 3694-3697.
- 16) 桑原克弘, 渡辺 靖, 和田光一, 他: IS1245 を用いた肺 *Mycobacterium avium* 症の臨床病型と多クローン性感染の関連についての分子疫学的検討. 結核. 2004; 79: 39-46.
- 17) 桑原克弘, 渡辺 靖, 和田光一, 他: 肺 *Mycobacterium avium* 症の家族内発症例に対する IS1245 をプローブとした分子疫学的検討. 結核. 2004; 79: 519-523.
- 18) Bauer J, Bengard A: Stability of Insertion Sequence IS1245, a Marker for Differentiation of *Mycobacterium avium* Strains. J of Clinical Microbiology. 1999; 37: 442-444.
- 19) Pestel-Caron M, Arbeir RD: Characterization of IS1245 for strain typing of *Mycobacterium avium*. J Clin Microbiol. 1998; 36: 1859-1863.
- 20) de Viedma GD, Roriguez AN, Andres S, et al.: Characterization of clonal complexity in tuberculosis by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing. J Clin Microbiol. 2005; 43: 5660-5664.
- 21) 森山 誠, 小川賢二, 西森 敬, 他: 臨床由来 *Mycobacterium avium* における Variable Numbers of Tandem Repeats 型別解析法の有用性の検討. 結核. 2006; 81: 559-566.
- 22) Bauer J, Bengard A, Kremer K, et al.: Usefulness of Spoligotyping To Discriminate IS6110 Low-Copy-Number

Mycobacterium tuberculosis Complex Strains Cultured in
Denmark. Journal of Clinical Microbiology. 1999 ; 37 :

2602-2606.

Original Article

COMPARISON OF USEFULNESS BETWEEN
VARIABLE NUMBERS OF TANDEM REPEATS (VNTR) ANALYSIS AND
RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP)
IN THE GENOTYPING OF *MYCOBACTERIUM AVIUM*

¹Yuko KAZUMI, ¹Tadashi UDAGAWA, ¹Shinji MAEDA, ¹Yoshirou MURASE,
¹Isamu SUGAWARA, ²Masao OKUMURA, ³Yuka AZUMA, ⁴Mieko GOTO,
and ⁵Noriko TSUNEMATSU

Abstract [Objectives] Comparison of usefulness of IS/245 RFLP and VNTR in *M. avium* genotyping.

[Materials and methods] Thirty-six cases (55 strains) from sputum and BALF and twelve cases (29 strains) isolated from blood of HIV-infected patients were used. VNTR and RFLP using IS/245 were performed.

[Result] Multiple samples were taken from 16 patients and 52 clinical isolates were used for VNTR and RFLP for comparison. (1) VNTR and RFLP results were identical in 12 out of 16 cases whose samples were collected several times. (2) Eight isolates were obtained from one patient. In this eight isolates, there were the cases of *M. avium* polyclonal infection and of mixed infection with *M. intracellulare*. VNTR patterns were two types and RFLP were 5 kinds of different in this case. (3) VNTR patterns of six isolates from one HIV-infected patient were identical, but there were three variations in RFLP patterns.

There were three cases of mixed infections with *M. tuberculosis* or *M. intracellulare*, and six strains polyclonal infection of *M. avium* (7.1%) in 84 isolates. These 6 clinical isolates were derived from sputum or BALF (5 strains) and HIV-infected blood (one strain).

VNTR patterns were similar in four pairs (9 strains) who did not contact closely, but they were distinguished clearly by RFLP. Seventeen strains had three or less IS/245-related bands in RFLP analyses of 89 strains.

[Discussion] As there is a possibility of polyclonal infection with *M. avium* and mixed infection with other species, the single clonal infection should be confirmed first by VNTR. When single colony was obtained, VNTR and RFLP were performed for genotyping of *M. avium*. Furthermore, strains with less bands by RFLP should be carefully judged in terms of both VNTR and RFLP. It is recommended that the specimens should be collected from each patient several times.

Key words: *Mycobacterium avium*, Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Polyclonal

¹Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA), ²Respiratory Medicine, and ³Medical Laboratory, Fukujiji Hospital, JATA, ⁴Department of Infection Control and Prevention, The University of Tokyo Hospital, ⁵Department of Clinical Laboratory, Tokyo Metropolitan Otsuka General Hospital

Correspondence to: Yuko Kazumi, TB Information Division (Molecular Epidemiology & Genetic Identification), Mycobacterium Reference Center, The Research Institute of Tuberculosis, JATA, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-8533 Japan. (E-mail: kazumi@jata.or.jp)

Evaluation of variable numbers of tandem repeat as molecular epidemiological markers of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan

Takayuki Wada,¹ Shinji Maeda,² Atsushi Hase¹ and Kazuo Kobayashi³

Correspondence

Takayuki Wada
taka-wada@city.osaka.lg.jp

¹Department of Microbiology, Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences, 8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan

²Molecular Epidemiology and Genetic Identification, Mycobacterium Reference Center, Research Institute of Tuberculosis, 3-1-24 Matsuyama, Kiyose, Tokyo 204-8533, Japan

³Department of Immunology, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

Using 243 *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in 2001 in Osaka City, Japan, the discriminatory power of variable numbers of tandem repeats (VNTRs) of 12 standard mycobacterial interspersed repetitive units (MIRUs) was assessed. The biggest cluster defined by MIRU-VNTRs consisted of 57 (23.5%) isolates and they belonged to the Beijing family based on spoligotyping. When additional VNTR loci were included in the MIRU-VNTR analysis, the 57 originally clustered strains were further differentiated by the addition of Queen's University Belfast (QUB)-VNTRs, but not exact tandem repeat-VNTR. The allelic diversity of additional VNTR loci such as VNTR 3232 (QUB-3232), VNTR 2163a (QUB-11a), VNTR 2163b (QUB-11b) and VNTR 1982 (QUB-18) was high in the 57 strains. When the 243 *M. tuberculosis* isolates were analysed using 16-locus VNTR (the 12 standard MIRUs and the 4 QUB loci) and IS6110 RFLP, the respective Hunter–Gaston discriminatory indexes were 0.9966 and 0.9971. The discrimination power of 16-locus VNTR was equal to that of IS6110 RFLP analysis. If appropriate loci are added to the standard MIRU analysis, VNTR genotyping could be a valuable tool for strain typing and epidemiological research of *M. tuberculosis* in Japan.

Received 6 October 2006

Accepted 16 March 2007

INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) remains a major public health threat to the world population. The gold standard method for molecular epidemiological analyses for TB is IS6110 RFLP Southern blotting (Cave *et al.*, 1991; Kremer *et al.*, 1999; van Embden *et al.*, 1993). However, it has some limitations, such as the long time for culturing TB bacilli, technical difficulties and the troublesome comparison of data obtained at different laboratories. Therefore, some alternative strategies and methods for epidemiological analysis of TB have been evaluated and reported recently.

Spoligotyping is the most popular PCR-based molecular analytical method in many countries (Kamerbeek *et al.*, 1997). Nevertheless, this method is not informative for *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family strains because

almost all strains in this family share an identical spoligotyping pattern (Glynn *et al.*, 2002; Kremer *et al.*, 2004). Variable numbers of tandem repeat (VNTR) typing is also PCR-based. It amplifies various loci of minisatellites on a genome and enumerates their units as a molecular marker (Supply *et al.*, 2000). In some reports, the discriminatory capacity of VNTR typing with 12 mycobacterial interspersed repetitive units (MIRUs) is comparable to that of IS6110 RFLP in North America and Europe (Blackwood *et al.*, 2004; Mazars *et al.*, 2001). The Centers for Disease Control and Prevention (CDC) in the USA have adopted it as a standard typing method (Cowan *et al.*, 2005; CDC, 2004).

Although convenient genotyping of *M. tuberculosis* isolates has been achieved, the 12-locus MIRU-VNTR has yielded insufficient discrimination for Beijing strains. Therefore, analyses of various additional VNTR loci for such isolates have been undertaken (Kam *et al.*, 2006; Kremer *et al.*, 2005b; Nikolayevskyy *et al.*, 2006; Surikova *et al.*, 2005). Recently, novel standards, 15- or 24-loci MIRU-VNTR methods, were proposed based on analyses of strains from cosmopolitan origins (Supply *et al.*, 2006).

Abbreviations: ETR, exact tandem repeat; HGDI, Hunter–Gaston discriminatory index; MIRU, mycobacterial interspersed repetitive unit; QUB, Queen's University Belfast; TB, tuberculosis; VNTR, variable numbers of tandem repeat.

A table of VNTR profiles for the strains is available as supplementary material with the online version of this paper.

Beijing/W family has been reported to be predominantly spread throughout eastern Asia (Chan *et al.*, 2001; van Soolingen *et al.*, 1995). These strains are also present across former Soviet Union countries (Nikolayevskyy *et al.*, 2006) and other areas, like the USA (Bifani *et al.*, 2002). For application of the VNTR method to epidemiological analysis of *M. tuberculosis* in Japan, we performed IS6110 RFLP typing, spoligotyping and 12-locus standard or some additional locus VNTR analyses. These data might be useful to select appropriate VNTR loci for the genotyping of *M. tuberculosis* in Japan.

METHODS

Bacterial strains and DNA isolation. A total of 243 *M. tuberculosis* strains were collected at the Department of Microbiology, Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences, from culture-confirmed pulmonary TB patients who were reported to the public health centre of Osaka, Osaka City, Japan, between January 1 and December 31 2001. All the available isolates collected in the period were used for this study. They were obtained mainly from three hospitals and two medical centres in Osaka. The mean incidence of TB in Japan is 27.9 per 100 000 population, but the incidence is much higher in Osaka City (82.6 per 100 000 population). Mycobacterial genomic DNA was prepared from bacteria grown on Ogawa medium using a combination of phenol/chloroform extraction and mechanical disruption. The DNA concentration was estimated using UV absorbance at 260 nm; then it was adjusted to 20 µg ml⁻¹.

Molecular typing methods. IS6110 RFLP typing was performed according to a standardized protocol (van Embden *et al.*, 1993). The band patterns were analysed using dedicated software (Molecular Analyst; Bio-Rad Laboratories). The spoligotyping method (Kamerbeek *et al.*, 1997) was also performed according to a standard protocol (Molhuizen *et al.*, 1998), except for the use of positively charged nylon membranes and DIG-labelled probes (Roche Diagnostic Systems) in place of biotin-labelled probes.

For this study, VNTR typing was performed with *Ex Taq* and GC PCR buffer I (TaKaRa Holdings). The sequences of the primers for amplification of 12 loci of MIRUs (MIRU-02, 04, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39 and 40), 4 loci of exact tandem repeats (ETRs) (ETR-A, B, C and F) and 8 loci of Queen's University Belfast (QUBs)-VNTR (QUB-11a, 11b, 15, 18, 23, 26, 1895, 3232 and 3336) were selected according to descriptions in other studies (Frothingham & Meeker-O'Connell, 1998; Kremer *et al.*, 2005b; Skuce *et al.*, 2002; Supply *et al.*, 2001). The PCR mixture was prepared in a 20 µl volume with 1 × GC PCR buffer I, 0.005 U *Ex Taq*, 200 µM each of the four dNTPs, 0.4 µM each primer set and 10 ng template DNA. The PCR conditions were as follows: initial denaturation at 95 °C for 10 min, and then 35 cycles of 95 °C for 1 min, 60 °C for 1 min and 72 °C for 1 min.

VNTR analysis of amplified DNA fragments. The sizes of amplified DNA fragments were determined using capillary array electrophoresis analysis equipment (*i-chip* SV1210; Hitachi Electronics Engineering). Using this equipment, sizes of DNA fragments were calculated digitally in six minutes. Their respective copy numbers were calculated from their size and assigned according to the number of repeats for each locus, and in agreement to published allelic tables (Supply *et al.*, 2001) or as described elsewhere (Frothingham & Meeker-O'Connell, 1998; Kremer *et al.*, 2005b; Skuce *et al.*, 2002; Supply *et al.*, 2001). The accuracy of calculation was determined through comparison with a DNA ladder, as a fragment-size standard, and confirmed through analysis of H37Rv.

Allelic diversity and discrimination. The allelic diversity (h) at each VNTR locus was calculated using the equation $h = 1 - \sum x_i^2$, where x_i is the frequency of the i th allele at the locus, as used in previous works (Kremer *et al.*, 2005b; Sun *et al.*, 2004). The Hunter-Gaston discriminatory index (HGDI) was calculated in accordance with a method, explained in another paper, to evaluate the combination of some VNTR loci (Hunter & Gaston, 1988).

RESULTS

Genotyping analyses of total isolates

All the 243 isolates were analysed using spoligotyping, MIRU-VNTR and IS6110 RFLP analyses. The numbers of clusters observed when performing IS6110 RFLP and 12-loci MIRU-VNTR were roughly equal (27 in RFLP and 28 in VNTR) (Table 1). However, the respective percentages of clustering isolates by RFLP and VNTR analyses were 30.9 and 70.8%. The biggest cluster sizes were 7 (2.8%) for RFLP and 57 (23.5%) for 12-locus MIRU-VNTR. The respective HGDI values of MIRU-VNTR and IS6110 RFLP were 0.928 and 0.997. The discriminatory power of spoligotyping was lower (0.585), in the population, because it had no discrimination on 154 (63.4% of strains) Beijing genotype isolates that shared an identical spoligotyping pattern. Moreover, 39 isolates were identified as Beijing-like strains based on the definition in a spoligotyping pattern proposed previously (Kremer *et al.*, 2004; Supplementary Table S1 available with the online journal).

Analyses of 57 MIRU-identical isolates

Analyses by spoligotyping and MIRU-VNTR showed that the 57 isolates in the biggest MIRU-VNTR defined cluster belonged to the Beijing family (Supplementary Table S1 available with the online journal) and possessed identical

Table 1. Comparison of the discriminatory power of three molecular typing methods in 243 *M. tuberculosis* strains from Osaka City

Typing method	Total no. of type patterns	No. of unique types	No. of clusters	No. of clustered isolates (%)	Maximum no. of isolates in a cluster	HGDI*
IS6110 RFLP	195	168	27	75 (30.9)	7	0.997
Spoligotyping	38	25	13	218 (89.7)	154	0.585
12-loci MIRU-VNTR	99	71	28	172 (70.8)	57	0.928

*HGDI was calculated as described by Hunter & Gaston (1988).

Table 2. The allelic profiles of each additional VNTR locus in 57 MIRU-identical strains

VNTR locus	No amplification	Copy no. of repetitive unit(s)															<i>h</i> index*	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		16 and over†
VNTR 2165 (ETR A)		1	3	1	52													0.164
VNTR 2461 (ETR B)		2	51	3			1											0.132
VNTR 577 (ETR C)					57													0.000
VNTR 3239 (ETR F)		1§	6	47	3													0.306
VNTR 2163a (QUB-11a)	1					16	1	5	23	1							10	0.740
VNTR 2163b (QUB-11b)			4	5	3	9	13	17	5	1								0.811
VNTR 1982 (QUB-18)								6	19	1	28	3						0.633
VNTR 1612 (QUB-23)						1	55	1										0.068
VNTR 4052 (QUB-26)				2			2	3	41		8	1						0.457
VNTR 1895 (QUB-1895)			5		52													0.160
VNTR 3232 (QUB-3232)							2			2	1	9	6	14	8		15	0.851
VNTR 3336 (QUB-3336)		1	3	1	42	5		5										0.438

**h* index represents the allelic diversity of each locus, calculated as described in Methods.

†The number of strains that had more than 16 copies in the locus are represented all together in this column.

§The deletion of 3'-terminal 24 bp of a unit, which is present in nearly all isolates, was absent from this isolate.

MIRU genotypes (223325173533, sequentially in MIRU locus number). *M. tuberculosis* strains with this specific MIRU genotype accounted for 29.5% (57/193) of the Beijing and Beijing-like strains in Osaka. Using these MIRU-identical isolates, we analysed the discriminatory abilities of other VNTR loci. From the *h* index, high allelic diversity among the 57 strains was observed at VNTR 3232 (QUB-3232), VNTR 2163a (QUB-11a), VNTR 2163b (QUB-11b) and VNTR 1982 (QUB-18) (Table 2). On the other hand, the four ETR loci that were the standard loci of additional VNTR analyses were insufficient to discriminate these strains and offered a low allelic diversity in this cluster (showing an *h* index of 0 for ETR C and 0.306 for ETR F). Using our PCR conditions, the locus VNTR 3155 (QUB-15) could not be amplified (data not shown).

Assessment of the combination of additional VNTR loci

To confirm the combination of four QUB loci (VNTR 3232, VNTR 2163a, VNTR 2163b and VNTR 1982) as an additional VNTR loci set, their genotypes were compared with IS6110 RFLP analysis in 57 MIRU-identical strains. Among 11 clusters defined by the 4 QUB loci, 7 clusters were completely consistent with clusters identified using IS6110 RFLP analysis (data not shown). Isolates in each of the remaining four clusters showed nearly identical RFLP patterns (Fig. 1). A one band difference was observed in three clusters (clusters A, B and C) and the isolates in the remaining cluster D showed a two band difference. The discriminatory power of these four additional loci was

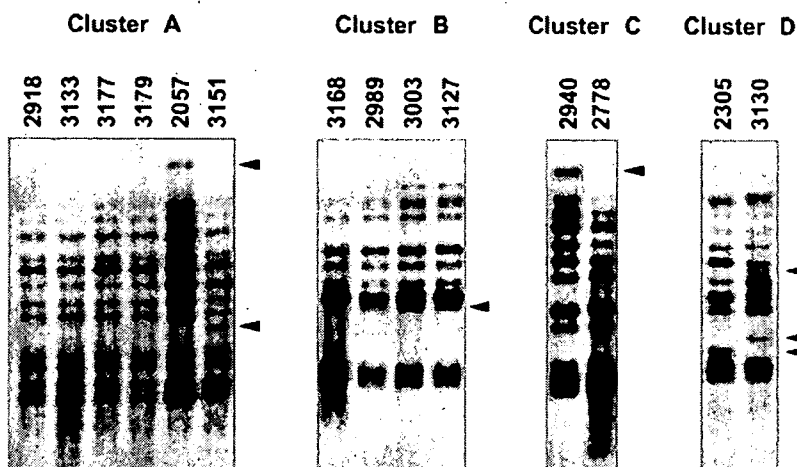


Fig. 1. Differences of IS6110 RFLP in isolates sharing the same QUB(4)-VNTR genotype. IS6110 RFLP genotypes were compared for four clusters (A, B, C and D) that represented the same QUB(4)-VNTR types but different IS6110 RFLP types in 57 MIRU-identical strains. Arrowheads indicate the differences in band pattern(s) of respective clusters.

Table 3. The allelic profiles of four candidates for additional VNTR loci in 243 *M. tuberculosis* strains from Osaka City

VNTR locus	No amplification	Copy no. of repetitive unit(s)															h index*	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		16 and over†
VNTR 2163a (QUB-11a)	13		24		9	22	3	22	102	35	1						12	0.772
VNTR 2163b (QUB-11b)	7		2	27	21	25	26	56	62	9	5						1	0.837
VNTR 1982 (QUB-18)		2	8	9	2	23	5	16	51	16	104	7						0.751
VNTR 3232 (QUB-3232)				5	1	28	7	6	3	9	13	6	26	20	35	25	59	0.910

*h index represents the allelic diversity of each locus, calculated as described in Methods.

†The number of strains that had more than 16 copies in the locus are represented all together in this column.

confirmed by analysing the remaining strains from the collection (186 isolates). The diversity of 4 loci, which offered high allelic diversity in 57 MIRU-identical strains, was also high in the 243 total strains (Table 3). We performed 16-loci VNTR [MIRU(12)+QUB(4)] analyses for the remaining 186 TB isolates to assess the efficiency of the addition of 4 loci to MIRU-VNTR. The VNTR profiles of all 243 isolates are listed in Supplementary Table S1 available with the online journal. The respective percentages of clustering isolates by RFLP and VNTR analyses were 30.9 and 36.6%. The maximum cluster sizes of these analyses were seven for RFLP and eight for VNTR (Table 1, 4). The HGDI values were similar (0.9971 for RFLP and 0.9966 for VNTR).

DISCUSSION

The search for more appropriate genetic markers for the discrimination of *M. tuberculosis* isolates has led to the evaluation and selection of additional VNTR loci designated ETRs, QUBs, Mtub and other loci (Kremer *et al.*, 2005a; Le Flèche *et al.*, 2002; Roring *et al.*, 2002, 2004; Skuce *et al.*, 2002; Smittipat *et al.*, 2005; Warren *et al.*, 2004). For discriminating Beijing strains, a high efficiency of VNTR loci showing hyper-variability, such as some QUBs, has been reported (Kam *et al.*, 2006; Kremer *et al.*, 2005b; Nikolayevskyy *et al.*, 2006; Surikova *et al.*, 2005). The proposed optimized MIRU-VNTR typing excludes these loci because of their size allele designation and

hyper-variability (Supply *et al.*, 2006). In our data, VNTR 2163a and VNTR 2163b could not be amplified from 13 and 7 isolates (5.3 and 2.9% of strains), respectively. Moreover, 59 isolates (24.3%) had copy numbers greater than 16 for VNTR 3232 (Table 3). These results pose a problem for the reliable sizing of amplicons and efficient allele assignment. However, in agreement to the results obtained, VNTR analyses of hyper-variable loci might be useful in some cases to discriminate W-Beijing strains that possess high clonality. Oelemann *et al.* (2006) used a combination of novel optimized VNTR and spoligotyping, which might be inappropriate for discrimination of strains of Beijing family.

Our data showed that 193 isolates (79.4% of the strains) were Beijing family strains, suggesting that such strains are prevalent in Japan, as in other East Asian areas (Bifani *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 2001; van Soolingen *et al.*, 1995). The discrimination by 12-loci MIRU-VNTR was low in Osaka because of the high prevalence of Beijing strains. This result indicates that, at least, 12-locus MIRU-VNTR is of limited value as a genotyping method of TB in Japan. We selected four QUB loci (VNTR 3232, VNTR 2163a, VNTR 2163b and VNTR 1982) that offered high allelic diversity, within the cluster, to adapt MIRU-VNTR analysis as a promising genotyping method for TB in Japan. The allelic diversity of these loci was consistent with that described in other reports related to analyses of Beijing strains (Kam *et al.*, 2006; Kremer *et al.*, 2005b; Nikolayevskyy *et al.*, 2006; Surikova *et al.*, 2005).

Table 4. The discriminatory power of 16-loci VNTR [MIRU+QUB(4)] in 243 *M. tuberculosis* strains from Osaka City

Typing method	Total no. of type patterns	No. of unique types	No. of clusters	No. of clustered isolates (%)	Maximum no. of isolates in a cluster	HGDI*
MIRU+QUB(4) VNTR†	188	154	34	89 (36.6)	8	0.9966

*HGDI was calculated as described by Hunter & Gaston (1988).

†QUB(4) VNTR included QUB-11a, QUB-11b, QUB-18 and QUB-3232. According to new nomenclature, these are equivalent to VNTR 2163a, VNTR 2163b, VNTR 1982 and VNTR 3232, respectively.

The QUB(4) loci were highly discriminatory in the 57 MIRU-identical clustered Beijing isolates, the performance was almost equivalent to that of IS6110 RFLP. The clusters A, B and C in Fig. 1 showed only one band difference in IS6110 RFLP. These clusters are therefore likely to represent transmission clusters. These clusters were also consistent with MIRU(12)+QUB(4) defined clusters, suggesting the usefulness of the addition of QUB(4) VNTR typing in defining transmission clusters. In all of the 243 strains, the cluster analysis and the discriminatory power of MIRU(12)+QUB(4) were comparable to that of IS6110 RFLP (Table 4). These results demonstrated that the VNTR method can be used as an alternative for IS6110 RFLP typing in Japan.

Our approach for evaluating an alternative VNTR set, as a genotyping marker system for TB surveillance, was the addition of optional loci to a standard loci set to supplement its low discriminatory power for Beijing family strains. Such a strategy might facilitate both international comparison of epidemiological information and local discrimination of endemic isolates such as strains of the Beijing family.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to A. Tamaru, Department of Microbiology, Osaka Prefectural Institute of Public Health, Osaka, Japan, for assistance with DNA electrophoresis using *i-chip* SV1210 apparatus. This work was supported by grants from the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare (Research on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, Health Sciences Research Grants), Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Ministry of the Environment (Global Environment Research Fund), United States – Japan Cooperative Medical Science Program against Tuberculosis and Leprosy, and Daido Life Welfare Foundation and Ohyama Health Foundation.

REFERENCES

- Bifani, P. J., Mathema, B., Kurepina, N. E. & Kreiswirth, B. N. (2002). Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends Microbiol* 10, 45–52.
- Blackwood, K. S., Wolfe, J. N. & Kabani, A. M. (2004). Application of mycobacterial interspersed repetitive unit typing to Manitoba tuberculosis cases: can restriction fragment length polymorphism be forgotten? *J Clin Microbiol* 42, 5001–5006.
- Cave, M. D., Eisenach, K. D., McDermott, P. F., Bates, J. H. & Crawford, J. T. (1991). IS6110: conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilization in DNA fingerprinting. *Mol Cell Probes* 5, 73–80.
- CDC (2004). *Handbook for TB Controllers, Epidemiologists, Laboratorians, and Other Program Staff*. National TB Controllers Association/CDC Advisory Group on Tuberculosis Genotyping. Atlanta, GA: CDC. <http://www.cdc.gov/nchstp/tb/genotyping/toc.htm>
- Chan, M. Y., Borgdorff, M., Yip, C. W., de Haas, P. E., Wong, W. S., Kam, K. M. & Van Soolingen, D. (2001). Seventy percent of the *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Hong Kong represent the Beijing genotype. *Epidemiol Infect* 127, 169–171.
- Cowan, L. S., Diem, L., Monson, T., Wand, P., Temporado, D., Oemig, T. V. & Crawford, J. T. (2005). Evaluation of a two-step approach for large-scale, prospective genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the United States. *J Clin Microbiol* 43, 688–695.
- Frothingham, R. & Meeker-O'Connell, W. A. (1998). Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* 144, 1189–1196.
- Glynn, J. R., Whiteley, J., Bifani, P. J., Kremer, K. & van Soolingen, D. (2002). Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerg Infect Dis* 8, 843–849.
- Hunter, P. R. & Gaston, M. A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 26, 2465–2466.
- Kam, K. M., Yip, C. W., Tse, L. W., Leung, K. L., Wong, K. L., Ko, W. M. & Wong, W. S. (2006). Optimization of variable number tandem repeat typing set for differentiating *Mycobacterium tuberculosis* strains in the Beijing family. *FEMS Microbiol Lett* 256, 258–265.
- Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R. & other authors (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 35, 907–914.
- Kremer, K., van Soolingen, D., Frothingham, R., Haas, W. H., Hermans, P. W., Martin, C., Palittapongarnpim, P., Plikaytis, B. B., Riley, L. W. & other authors (1999). Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* 37, 2607–2618.
- Kremer, K., Glynn, J. R., Lillebaek, T., Niemann, S., Kurepina, N. E., Kreiswirth, B. N., Bifani, P. J. & van Soolingen, D. (2004). Definition of the Beijing/W lineage of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of genetic markers. *J Clin Microbiol* 42, 4040–4049.
- Kremer, K., Arnold, C., Cataldi, A., Gutierrez, M. C., Haas, W. H., Panaiotov, S., Skuce, R. A., Supply, P., van der Zanden, A. G. & van Soolingen, D. (2005a). Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *J Clin Microbiol* 43, 5628–5638.
- Kremer, K., Au, B. K., Yip, P. C., Skuce, R., Supply, P., Kam, K. M. & van Soolingen, D. (2005b). Use of variable-number tandem-repeat typing to differentiate *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from Hong Kong and comparison with IS6110 restriction fragment length polymorphism typing and spoligotyping. *J Clin Microbiol* 43, 314–320.
- Le Flèche, P., Fabre, M., Denoeud, F., Koeck, J. L. & Vergnaud, G. (2002). High resolution, on-line identification of strains from the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on tandem repeat typing. *BMC Microbiol* 2, 37.
- Mazars, E., Lesjean, S., Banuls, A. L., Gilbert, M., Vincent, V., Gicquel, B., Tibayrenc, M., Loch, C. & Supply, P. (2001). High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1901–1906.
- Molhuizen, H. O., Bunschoten, A. E., Schouls, L. M. & van Embden, J. D. (1998). Rapid detection and simultaneous strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria by spoligotyping. *Methods Mol Biol* 101, 381–394.
- Nikolayevskyy, V., Gopaul, K., Balabanova, Y., Brown, T., Fedorin, I. & Drobniewski, F. (2006). Differentiation of tuberculosis strains in a population with mainly Beijing-family strains. *Emerg Infect Dis* 12, 1406–1413.
- Oelemann, M. C., Diel, R., Vatin, V., Haas, W., Rusch-Gerdes, S., Loch, C., Niemann, S. & Supply, P. (2006). Assessment of an

- optimized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing system combined with spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 45, 691–697.
- Roring, S., Scott, A., Brittain, D., Walker, I., Hewinson, G., Neill, S. & Skuce, R. (2002). Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. *J Clin Microbiol* 40, 2126–2133.
- Roring, S., Scott, A. N., Glyn Hewinson, R., Neill, S. D. & Skuce, R. A. (2004). Evaluation of variable number tandem repeat (VNTR) loci in molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Ireland. *Vet Microbiol* 101, 65–73.
- Skuce, R. A., McCorry, T. P., McCarroll, J. F., Roring, S. M., Scott, A. N., Brittain, D., Hughes, S. L., Hewinson, R. G. & Neill, S. D. (2002). Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology* 148, 519–528.
- Smittipat, N., Billamas, P., Palittapongarnpim, M., Thong-On, A., Temu, M. M., Thanakijcharoen, P., Karnkawinpong, O. & Palittapongarnpim, P. (2005). Polymorphism of variable-number tandem repeats at multiple loci in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 43, 5034–5043.
- Sun, Y. J., Bellamy, R., Lee, A. S., Ng, S. T., Ravindran, S., Wong, S. Y., Locht, C., Supply, P. & Paton, N. I. (2004). Use of mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing to examine genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. *J Clin Microbiol* 42, 1986–1993.
- Supply, P., Mazars, E., Lesjean, S., Vincent, V., Gicquel, B. & Locht, C. (2000). Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol* 36, 762–771.
- Supply, P., Lesjean, S., Savine, E., Kremer, K., van Soolingen, D. & Locht, C. (2001). Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 39, 3563–3571.
- Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso-Oelemann, M., Rusch-Gerdes, S., Willery, E., Savine, E., de Haas, P., van Deutekom, H. & other authors (2006). Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 44, 4498–4510.
- Surikova, O. V., Voitech, D. S., Kuzmicheva, G., Tatkov, S. I., Mokrousov, I. V., Narvskaya, O. V., Rot, M. A., van Soolingen, D. & Filipenko, M. L. (2005). Efficient differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family from Russia using highly polymorphic VNTR loci. *Eur J Epidemiol* 20, 963–974.
- van Embden, J. D., Cave, M. D., Crawford, J. T., Dale, J. W., Eisenach, K. D., Gicquel, B., Hermans, P., Martin, C., McAdam, R. & other authors (1993). Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 31, 406–409.
- van Soolingen, D., Qian, L., de Haas, P. E., Douglas, J. T., Traore, H., Portaels, F., Qing, H. Z., Enkhsaikan, D., Nymadawa, P. & van Embden, J. D. (1995). Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J Clin Microbiol* 33, 3234–3238.
- Warren, R. M., Victor, T. C., Streicher, E. M., Richardson, M., van der Spuy, G. D., Johnson, R., Chihota, V. N., Locht, C., Supply, P. & van Helden, P. D. (2004). Clonal expansion of a globally disseminated lineage of *Mycobacterium tuberculosis* with low IS6110 copy numbers. *J Clin Microbiol* 42, 5774–5782.



解説

抗酸菌の分子疫学法*

和田 崇之** 前田 伸司***

Key Words : tuberculosis, Mycobacterium, molecular epidemiology, genotyping method

はじめに

分子疫学は菌株のゲノムDNA内に保有された遺伝子型別を解析し、そこから導き出された株情報を疫学的解析へと還元することを目的とするものである。遺伝子型別解析は従来の技術では見出せなかった菌株同士の相違、あるいは近似性を浮き彫りにする。集団感染における原因菌株の同定や拡散規模の把握、伝染経路の推定に手がかりを与えうる強力なツールといえるであろう。

結核菌は空気感染を主とした伝播様式を呈し、発症までに長期間を要することから、分離株の遺伝子型別は非常に有効な疫学情報となる。集団感染事例のみならず、網羅的に集められた結核菌の型別解析がサーベイランスとして試みられつつあり、結核菌遺伝子型のデータベース化は今や国際的な流れとなっている。このような分子疫学的な手法は、抜本的な結核制圧に向けた対策のひとつとして今後さらに重要性が増すものと考えられる。

本稿では、結核菌の遺伝子型別法として有用であるとされてきた3つの型別法、すなわち制限酵素断片長多型(restriction fragment length polymorphism ; RFLP)法¹⁾、spoligotyping法²⁾および縦列反復配列数多型(variable numbers of tandem repeat ; VNTR)法³⁾⁴⁾について、その原理と基盤となる遺伝子多型を解説する。また、わ

が国における結核菌の分布特性をふまえた上での分子疫学の展望および非結核性抗酸菌における遺伝子型別法について述べる。

遺伝子型別の疫学的応用

上述したように、結核菌の遺伝子型別とは、「菌株のゲノム内に存在する多型領域を解析、同定すること」である。これにより各菌株の遺伝子レベルでの相関が明らかとなり、それぞれの患者間の原因菌伝播を推定することが可能となる。たとえば、図1-Aのように集団感染が疑われるケースにおいて、各患者から分離された菌株の遺伝子型別の解析は大きな威力を発揮する。一方で、不特定多数の患者から分離された結核菌を網羅的に遺伝子型別解析し、未知の流行パターンや伝播経路を察知するといった試みも期待される(図1-B)。

いずれの場合においても、多型に乏しい遺伝子型別では異なる菌株が同一と判定される可能性が高くなり、逆に多型が著しく安定性に欠ける遺伝子型別では、同一感染源由来の菌株であっても不一致株と判定される傾向が強くなる。このような誤判定は、分子疫学が必ずしも万能でないことを意味するものである。疫学的用途と目的に合致した遺伝子型別を選択することだけでなく、既存の疫学的情報を前提とした総合的な解釈が重要であろう。

* Methods of molecular epidemiology for mycobacteria.

** Takayuki WADA, Ph.D.: 大阪市立環境科学研究所微生物保健(〒543-0026 大阪市天王寺区東上町8-34) ; Department of Microbiology, Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences, Osaka 543-0026, JAPAN

*** Shinji MAEDA, Ph.D.: 財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター結核菌情報科

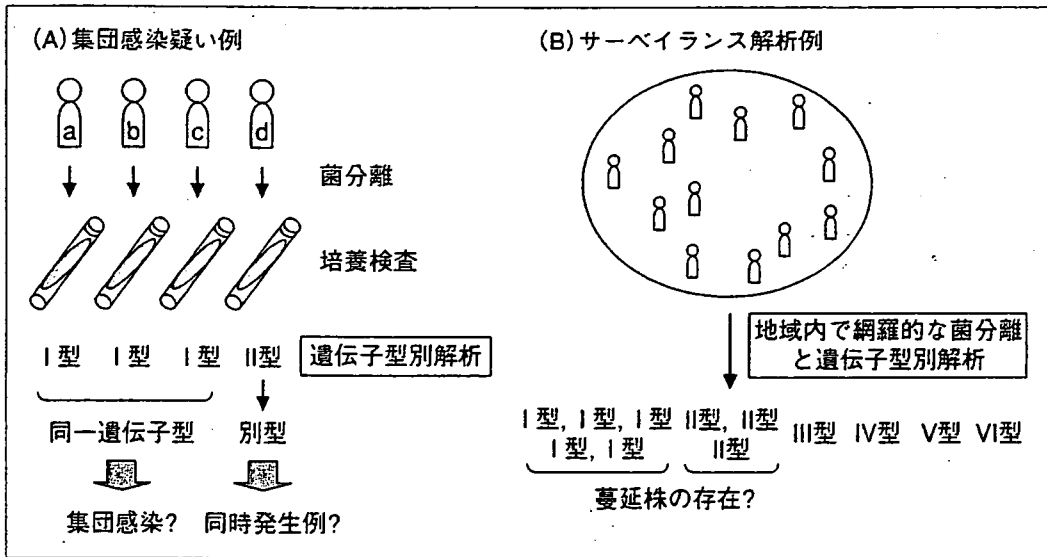


図1 分子疫学的解析の応用例

(A) 集団感染が疑われる事例において、分離菌を遺伝子型別により解析して伝播経路および規模を推定しうる。異なる遺伝子型を呈する菌株による発症である場合(患者d)、この患者はほかの感染源による同時発症例であることが示唆される。(B) ある地域や集団内における患者由来株の遺伝子型別を網羅的に解析し、菌株レベルでの分布傾向や蔓延状況を把握する。統計的解析から強毒性因子の探索や未知の伝播様式を推定することが可能である。

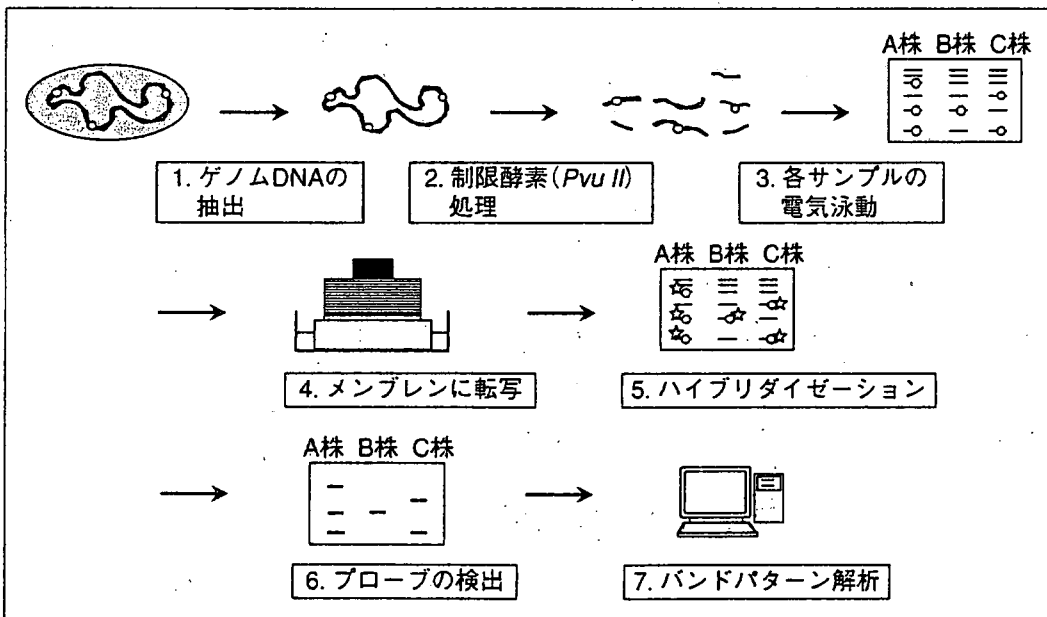


図2 RFLP法

培養した菌株から十分量のゲノムDNAを抽出し、IS6110を含むDNA制限断片(○)を、標識プローブ(☆)を反応させることにより検出する。得られたパターンはスキャナーによって画像データ化し、専用のソフトウェアを用いてコンピューター解析を行う。

結核菌の遺伝子型別法

1. RFLP法—もっとも普及した型別法

RFLP法は結核菌のゲノム内に複数個存在するトランスポゾンIS6110⁵⁾をサザンブロッティング

により検出し、そのコピー数とバンドパターンを解析する手法である(図2,3)。多型性が高いため信頼性があり、結核菌の型別法として多くの施設で用いられてきた。わが国でも同手法による分子疫学的応用が1990年代から行われてお

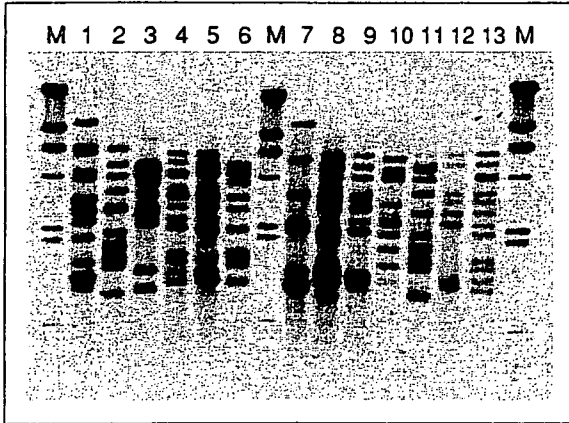


図3 RFLP法による結核菌の型別解析例.

IS6110を含んだ制限断片長多型はバンドパターンの相違として検出される(レーン1~13). 型別は画像データとして蓄積され, 同時に電気泳動した分子量マーカー(レーンM)を用いた補正によって互換性が与えられる.

り⁶⁾⁷⁾, とくに集団感染事例における分離株の解析に活用されている.

しかしながら, RFLP法の解析結果は画像データであり, その扱いは困難である⁸⁾. 多量のデータ蓄積とその解析に伴うCPU負荷の肥大化が生じるだけでなく, わずかな実験条件の差が解析

表1 RFLP解析の施設間互換性に影響を与える要因

ゲノムDNA抽出
サンプル純度, ゲノムDNA損傷の度合い
電気泳動
制限酵素処理条件, DNA濃度および量, ゲルの大きさ, 電圧, バッファー濃度, 泳動中の温度管理, 泳動槽, 分子量マーカー
サザンブロッティング
プローブ濃度, プローブ標識法, メンブレン転写条件, プローブのハイブリダイゼーションおよび洗浄条件
データ解析
現像, 画像ファイルの取り込み条件, バンド認識時の人為的影響

結果に影響を与えるため, 異なる施設間におけるデータ互換性が低い(表1). また, 多量のゲノムDNAを抽出しなくてはならず, 菌の分離培養に長期間を要するという問題点もある. このような理由により, 今後期待される大規模な結核疫学調査や型別データベースの構築にはRFLP法に代わる型別解析法が望まれている.

2. Spoligotyping法—東アジア地域に特異的な限界点

Spoligotyping法とは, DR(direct repeat)領域

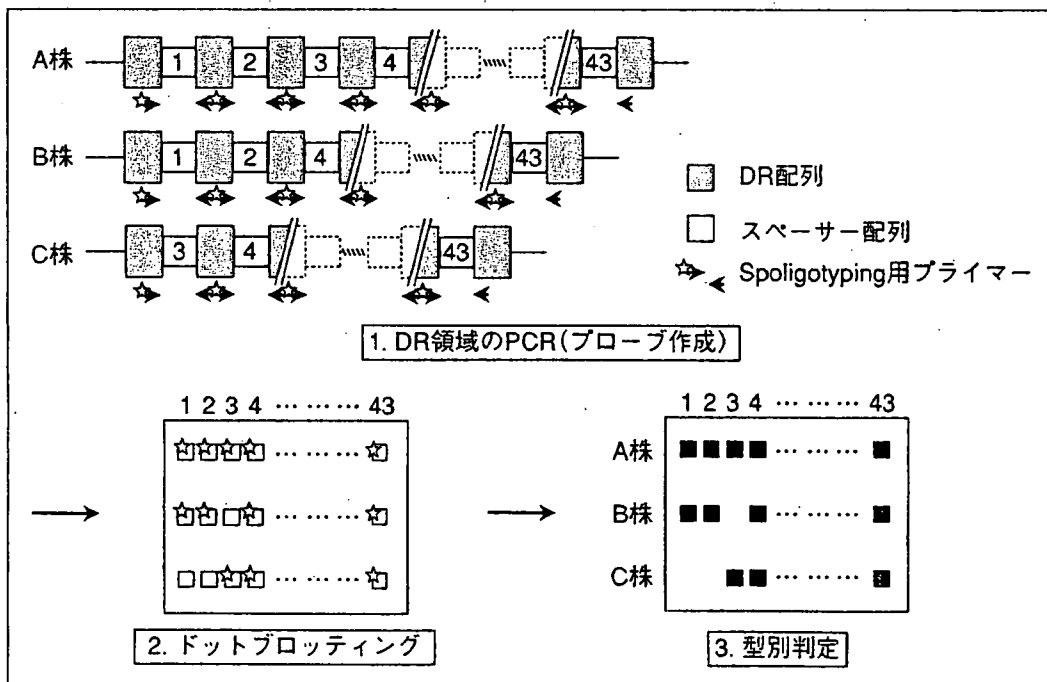


図4 Spoligotyping法

Spoligotyping法は, 繰り返し出現するDR配列に挟まれたスペーサー配列の有無が株により多型性を示すことを利用してタイピングする方法である. 共通するDR配列に相補的なプライマーを用いてPCR法で標識プローブを合成する. 43種のスペーサー配列から設計されたオリゴDNAをあらかじめスポットした膜と標識プローブをハイブリダイゼーションし, 反応の有無を検出する.

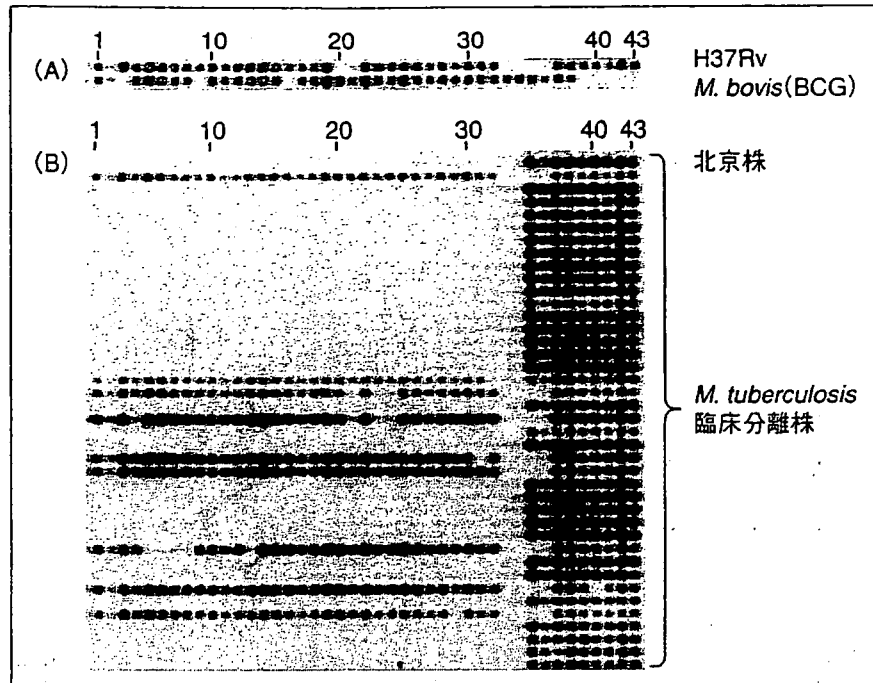


図5 Spoligotyping法による結核菌の型別解析例

(A)標準株H37Rvと*M. bovis*(BCG)Tokyo株のspoligotyping型別。*M. bovis*では39～43番目のスペーサー配列が欠失しており、菌種同定の手がかりとなる。(B)日本国内で分離される結核菌は大部分が北京型結核菌であり、spoligotyping型別の多型性が低い。北京型結核菌は1～34番目のスペーサー配列が欠失したパターンを示している。

と呼ばれるゲノム領域の多型性に着目して型別を行う手法である²⁾⁹⁾。DR領域は特定の塩基配列(DR配列)がスペーサー配列を挟みつつ連続して繰り返すゲノム構造を呈している(図4)。Spoligotyping法では結核菌群に特異的な43種のスペーサー配列の有無をドットプロットングにより判定し、そのパターンによって型別とする。結核菌との判別が難しい*M. bovis*が特徴的なパターンを示す⁹⁾ことから、BCGとの簡易判別にも応用可能である(図5-A)。

本手法では、各菌株由来のゲノムDNAを鋳型として、DR繰り返し配列に特異的なプライマーを用いたPCRによってスペーサー配列を増幅する。すなわち、微量のゲノムDNAを元に型別解析が可能であるという利点がある。また、スペーサー配列の有無というデジタルデータを供するため、比較が容易で互換性が高い。欧米諸国を中心として結核菌の分子疫学に多用されており、国際的なデータベースも構築されている^{10)~12)}。

しかしながら、わが国を含めた東アジア地域では、北京型結核菌と呼ばれるサブグループが広く蔓延(分離株の約80%)していることが知ら

れており^{13)~15)}、その結果spoligotyping法による型別分解能が非常に低い(図5-B)。このような地理的(疫学的)背景から、同手法に基づいた分子疫学はわが国では非効率的であり、その用途は著しく制限される。

3. VNTR法—高い互換性と幅広い応用性

結核菌の型別に有効な遺伝子多型として、数bp～数10bpの塩基配列をユニットとした繰り返し構造を示す縦列反復配列数多型(VNTR)領域がある¹⁶⁾。VNTR領域は結核菌ゲノム内に多数存在することが知られており、それぞれの領域が独立的に多型を示す(図6)。任意の領域をPCRによって個別に増幅し、増幅産物の大きさからそれぞれのユニット数を算出することで汎用性の高い型別法となる。

本手法もPCRを利用した型別法であることから、微量の結核菌由来DNAから解析が可能である。また、各ユニット数の羅列を型別とすることから、目的に応じた汎用性と高い互換性をあわせもつ理想的な型別法となりうる。

その高いポテンシャルから、VNTR法は解析領域の取捨選択と最適化について多数の研究がな

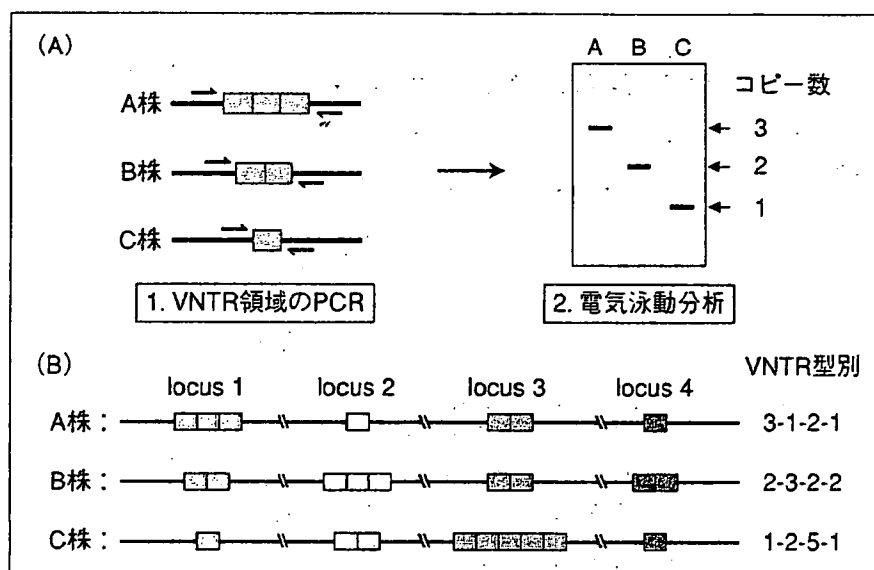


図6 VNTR法

(A)VNTR多型を示すゲノム領域をPCRによって増幅し、電気泳動を行って増幅産物のサイズを解析して繰り返し数を算出する。(B)実際には複数のVNTR領域を個別に解析し、それぞれの繰り返し数を羅列して型別とする。領域の組み合わせにより、目的に応じた型別解析が可能である。

表2 代表的なVNTR解析の領域組み合わせ

VNTR領域	解析領域数	特徴	引用文献
MIRU-VNTR	12	もっとも汎用される標準的組み合わせ。やや解像度が低い。	3, 4
ETR(Exact Tandem Repeat)	4	MIRU-VNTRの追加解析として、補助的に用いられることがある。	17
QUB(Queen's University Belfast)	4~11	非常に多型性に富む領域を含み、北京型結核菌の解析や型別の細分化に適する。	18, 19
Supply's 15(24)-locus system	15(24)	世界各国の分離菌を元に構築された組み合わせであり、global standardとしての用途が期待されている。	20
JATA(12)-VNTR	12	日本国内の臨床分離株を効率よく解析できる組み合わせ。	21

表3 各遺伝子型別法の特徴

型別法	基盤となる技術	所要時間	簡便性	互換性	型別解像度
RFLP	サザンブロッティング	4~5日 ¹⁾	低	低	高
spoligotyping	PCR/ドットブロッティング	2~3日	中	高	低 ²⁾ ~中
VNTR	PCR	約1日	高	高	低~高

¹⁾菌量を必要とするため、実際には結核菌の長期培養を行わなくてはならない。²⁾日本国内における北京型結核菌の蔓延に起因する。

されている^{3)(4)(17)~21)}(表2)。もっとも頻繁に用いられるVNTR領域はMIRU(Mycobacterium interspersed repetitive unit)-VNTRと名づけられた12領域³⁾⁽⁴⁾で、米国疾病予防管理センターが標準型別法として、あるいはより高い解像度を得るための追加解析法として採用している。ところが、北京型結核菌についてはspoligotyping法と同様にこれら12領域の多型性が低く²²⁾、より効果的な領

域の組み合わせを用いた国際的標準化が待たれている。近年Supplyらが提唱した15あるいは24領域の組み合わせ²⁰⁾は、国際標準としてもっとも有望視されている。北京株における多型性の検証²³⁾と合わせ、今後さらなるデータの蓄積が求められるところである。

以上の遺伝子型別法の特徴について表3にまとめたので、参照されたい。

わが国における結核菌の特性

わが国において分離される結核菌の約8割は北京型結核菌であり、ほかの東アジア諸国と共通した分布背景を示している。近年、わが国で分離された北京型結核菌の詳細な分析結果から、国内由来の北京型結核菌の大部分がユーラシア大陸部と遺伝子レベルで大きく異なることが明らかになってきた²⁴⁾。遺伝子型別の有効性は各地域において分離される結核菌の分布傾向に依存するため、解析法の選択は各地域の特徴を十分に反映した分離菌によって慎重に行うべきである。JATA(12)-VNTR²¹⁾は日本全国から網羅的に集められた結核菌を元に最適化されたものであり、わが国における結核分子疫学的解析の浸透に伴って標準的に利用できることが期待される。

その他の抗酸菌における分子疫学

ほかの抗酸菌においても、遺伝子型別を利用した分子疫学的解析が行われている。非定型抗酸菌症ではMAC(*M. avium* complex)あるいは*M. kansasii*などにおいて、それぞれに特異的なトランスポゾンを利用したRFLP法やパルスフィールド法などが用いられてきた²⁵⁾²⁶⁾。また、近年ではこれらの菌種にもVNTR領域が存在することが見出され、とりわけ*M. avium*ではすでにその解析手法が確立している²⁷⁾。らい菌では3塩基配列繰り返し領域(short tandem repeats: STR)の解析による型別²⁸⁾が試みられており、今後の展開が注目される。

おわりに

抗酸菌の分子疫学は集団感染事例の裏づけといった目的に留まらず、地域内における菌株レベルでの詳細な分布傾向や蔓延状況を把握する手段となりつつある。このような情報は未知の伝播ルートを推定するだけでなく、各株に内因する危険因子の同定や多剤耐性化の機序を知る上で有効な手がかりとなるであろう。本稿が抗酸菌の遺伝子型別ならびに分子疫学の普及の一助となれば幸いである。

文 献

- 1) van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting : recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol 1993 ; 31 : 406.
- 2) Molhuizen HO, Bunschoten AE, Schouls LM, et al. Rapid detection and simultaneous strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria by spoligotyping. Methods Mol Biol 1998 ; 101 : 381.
- 3) Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, et al. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. Proc Natl Acad Sci USA 2001 ; 98 : 1901.
- 4) Supply P, Lesjean S, Savine E, et al. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. J Clin Microbiol 2001 ; 39 : 3563.
- 5) van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, et al. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains : evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol 1991 ; 29 : 2578.
- 6) Takahashi M, Kazumi Y, Fukasawa Y, et al. Restriction fragment length polymorphism analysis of epidemiologically related *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Microbiol Immunol 1993 ; 37 : 289.
- 7) Chaicumpar K, Fujiwara N, Nishimura O, et al. Studies of polymorphic DNA fingerprinting and lipid pattern of *Mycobacterium tuberculosis* patient isolates in Japan. Microbiol Immunol 1997 ; 41 : 107.
- 8) Braden CR, Crawford JT, Schable BA. Quality assessment of *Mycobacterium tuberculosis* genotyping in a large laboratory network. Emerg Infect Dis 2002 ; 8 : 1210.
- 9) Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol 1997 ; 35 : 907.

- 10) Filliol I, Driscoll JR, Van Soolingen D, et al. Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligo-types. *Emerg Infect Dis* 2002 ; 8 : 1347.
- 11) Sola C, Filliol I, Gutierrez MC, et al. Spoligotype database of *Mycobacterium tuberculosis* : biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives. *Emerg Infect Dis* 2001 ; 7 : 390.
- 12) Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity : mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol* 2006 ; 6 : 23.
- 13) 大島律子, 多田敦彦. 岡山地区で分離された結核菌における Beijing family および他の遺伝子型. *結核* 2004 ; 79 : 47.
- 14) Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, et al. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis* : a systematic review. *Emerg Infect Dis* 2002 ; 8 : 843.
- 15) van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, et al. Prevalence of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J Clin Microbiol* 1995 ; 33 : 3234.
- 16) Supply P, Mazars E, Lesjean S, et al. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol* 2000 ; 36 : 762.
- 17) Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* 1998 ; 144 : 1189.
- 18) Skuce RA, McCorry TP, McCarroll JF, et al. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology* 2002 ; 148 : 519.
- 19) Roring S, Scott A, Brittain D, et al. Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis* : comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. *J Clin Microbiol* 2002 ; 40 : 2126.
- 20) Supply P, Allix C, Lesjean S, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2006 ; 44 : 4498.
- 21) 前田伸司, 村瀬良朗. 第82回総会シンポジウムIV. 抗酸菌研究の最前線. 反復配列多型を利用した結核菌の迅速遺伝子型別法の標準化. *結核* 2007 ; 82 : 784.
- 22) Wada T, Maeda S, Hase A, et al. Evaluation of variable numbers of tandem repeat as molecular epidemiological markers of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *J Med Microbiol* 2007 ; 56 : 1052.
- 23) Iwamoto T, Yoshida S, Suzuki K, et al. Hypervariable loci that enhance the discriminatory ability of newly proposed 15-loci and 24-loci variable-number tandem repeat typing method on *Mycobacterium tuberculosis* strains predominated by the Beijing family. *FEMS Microbiol Lett* 2007 ; 270 : 67.
- 24) 和田崇之, 長谷 篤, 前田伸司, ほか. 日本国内の北京型結核菌に見られる遺伝的特異性[会]. *結核* 2007 ; 82 : 372.
- 25) Pavlik I, Horvathova A, Dvorska L, et al. Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *J Microbiol Methods* 1999 ; 38 : 155.
- 26) 吉田志緒美, 鈴木克洋, 露口一成, ほか. *Mycobacterium kansasii*株における分子疫学的解明. *結核* 2007 ; 82 : 103.
- 27) 西森 敬, 内田郁夫, 田中 聖, ほか. VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats) 型別による結核菌群及び鳥型結核菌の分子疫学的解析マニュアル. *動衛研研究報告* 2003 ; (109) : 25.
- 28) 松岡正典, 張 良芬. ハンセン病の分子疫学. *日本ハンセン病学会雑誌* 2004 ; 73 : 7.

* * *

肺カンサシ症は、化学療法で結核同様に治癒が期待できるので、診断基準を満たした症例は全例治療するのが原則である。イソニアジド、RFP、EBの併用を排菌陰性化から1年間続けるのが標準療法である。ごくまれ(1%未満)に存在するRFP耐性例の場合、CAMやニューキノロンも併用する。治療期間が長く服薬コンプライアンスが悪くなりがちで、治療中断例が結核以上に多く、再発率が結核よりも高くなってしまおうのが大きな問題である。禁煙指導とあわせてこれらの点の説明や指導が大切である。



経過・予後

肺MAC症の大部分を占める結節・気管支拡張型の経過や予後は、症例ごとに大きく異なっているのが特徴である。無治療でも自然軽快する例やほとんど進行せずに10~20年経過する例から、最大限の治療をしても数年のうちに病変が進行し、呼吸不全から不幸な転帰をとる予後不良例まで存在する。一般的に化学療法がある程度奏効す

るが、治療を止めるとふたたび悪化するエピソードを繰り返しながら、5~10年のスケールでゆっくりと進行する比較的良好な経過をとる例が多い。喫煙者のブラ肺に合併した空洞・破壊型の肺MAC症は、一般的に比較的予後が悪く、外科療法が実施できない例では呼吸不全が数年のうちに進行することもある。

肺カンサシ症は、治療がしっかりできれば予後良好であるが、前述したように治療が途中で中断する例が結核以上に目立ち、再発する例が多い点に注意しなければならない。

参考文献

- 1) 坂谷光則, 倉島篤行, 佐藤滋樹, 鈴木克洋: 肺非結核性抗酸菌症の診断と治療. 呼吸, 24: 106~117, 2005.
- 2) 日本結核病学会非定型抗酸菌症対策委員会: 肺非結核性抗酸菌症診断に関する見解—2003年. 結核, 78: 569~572, 2003.
- 3) American Thoracic Society: Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 175: 367~416, 2007.

Medical Technology 別冊

新 染色法のすべて

●定評ある染色技術のカラー版マニュアル全面改訂版。現在検査室レベルで行われている、すべての領域での染色法を洗い直し、収録項目を165項目として充実。染色態度として600枚を越えるスライドと写真を収録、鮮明なカラー写真で提示している。

B5判
400頁
定価5,040円
(本体4,800円 税5%)

●弊社の全出版物の情報はホームページでご覧いただけます。 <http://www.ishiyaku.co.jp/>



医歯薬出版株式会社

〒113-8612 東京都文京区本駒込1-7-10

TEL. 03-5395-7610
FAX. 03-5395-7611



9. 抗酸菌の分子疫学解析とその応用

(財)結核予防会結核研究所 抗酸菌レファレンスセンター 結核菌情報科科长*/大阪市立環境科学研究所 微生物保健担当**
前田伸司*・和田崇之**



はじめに

結核は、空中を浮遊する菌を含んだ飛沫核を吸入することにより感染が成立する。しかし、発症や診断に時間がかかることから、感染源の特定や接触者調査などの感染拡大を防ぐための対応がむずかしい。集団発生が疑われる複数の患者から分離した結核菌が、同一株由来かを確認するための方法として、ファージを使った結核菌の型別法が1990年代に報告された。次いで、現在でも型別法のゴールドスタンダードとなっている挿入配列(IS)を利用した制限酵素断片長多型(restriction fragment length polymorphism, RFLP)分析法が報告された。このような分子疫学的解析法を利用することで、予測できなかった感染経路や疫学調査における誤りを科学的に証明することが可能となった。

現在使われている代表的な結核菌のタイピング方法としては、①RFLP分析法、②スポリゴタイピング法、③反復配列多型(variable numbers of tandem repeats, VNTR)分析法などがある(表1)。本稿では、これらの分析法の原理、問題点などを

解説する。



RFLP 分析法

RFLP分析法は、結核菌群がもつトランスポゾンの一つであるIS6110のコピー数と染色体上の挿入位置の多様性を利用して、結核菌を分類する方法である(図1)。分析は、①結核菌からゲノムDNAを精製し、Pvu IIで切断後、電気泳動を行う、②分離したDNAを膜に転写し、標識したIS6110プローブと反応させ、反応したバンドを検出する、というものである。

RFLP分析では、①サザンブロッティングが可能な1μg以上の純度の高いDNAが必要なので、菌を培養しなければならず時間がかかる(2~3週間)、②IS6110のコピー数が少ない時には使えない、③バンドの差異を肉眼で判断するので、電気泳動やゲルの状態により結果が変動する。そのため、多施設間でのデータ比較および共有はできない、などの欠点がある。また、本法は調製済みのDNAから分析を開始しても、結果を得るのに4~5日必要で手間がかかる分析法である。しかし、分解能や再現性がよいため、この分析法は結核菌

表1 各遺伝子型別法の特徴

型別法	基盤となる技術	所要時間 (調製済みDNAから)	簡便性	互換性	型別 解像度
RFLP	サザンブロッティング	4~5日 ¹⁾	低	低	高
スポリゴタイピング	PCR/ドットブロッティング	2日	中	高	低 ²⁾ ~中
VNTR	PCR	2日	高	高	低~高

¹⁾: 1μg以上のDNAが必要なため、実際には結核菌の長期培養を行わなくてはならない。

²⁾: 日本国内における北京型結核菌の蔓延に起因する。

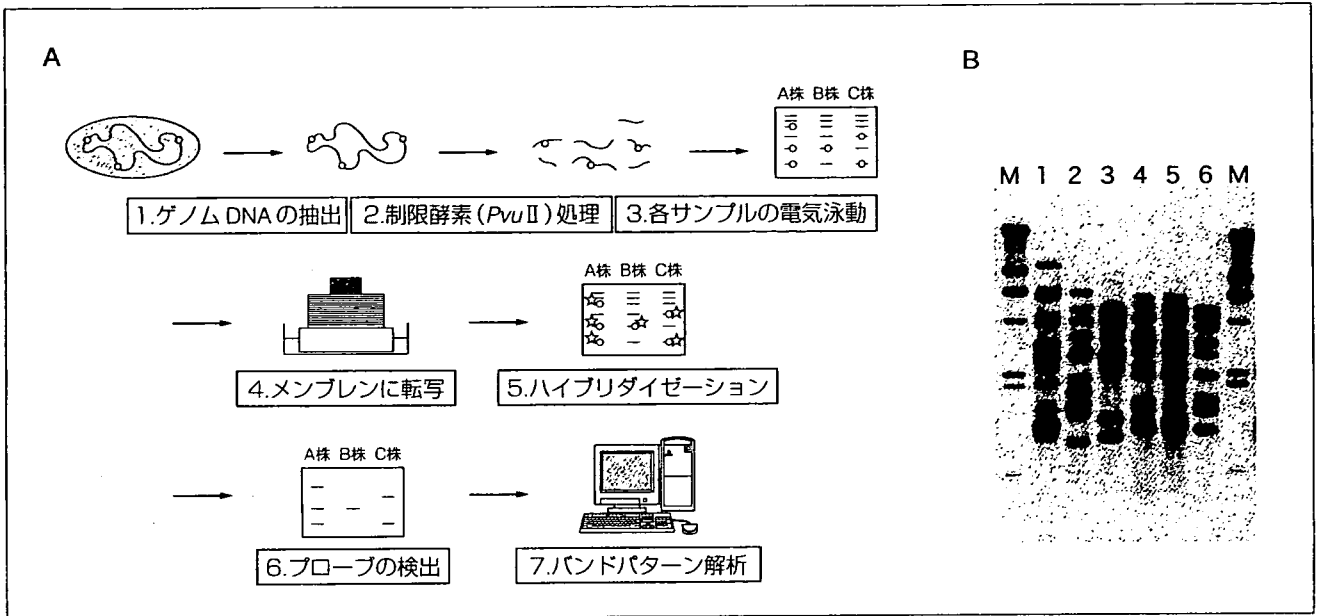


図 1 RFLP 法

A : 培養した菌株からゲノム DNA を抽出し、IS6110 を含む DNA 断片 (○) と標識プローブ (☆) を反応させることにより検出する。得られたパターンは画像データ化し、専用のソフトウェアを用いてコンピュータ解析を行う。

B : 解析例。型別結果は、バンドパターンの相違として検出される (レーン 1~6)。同時に電気泳動した分子量マーカー (レーン M) を用いた補正によって、データの互換性が与えられる。

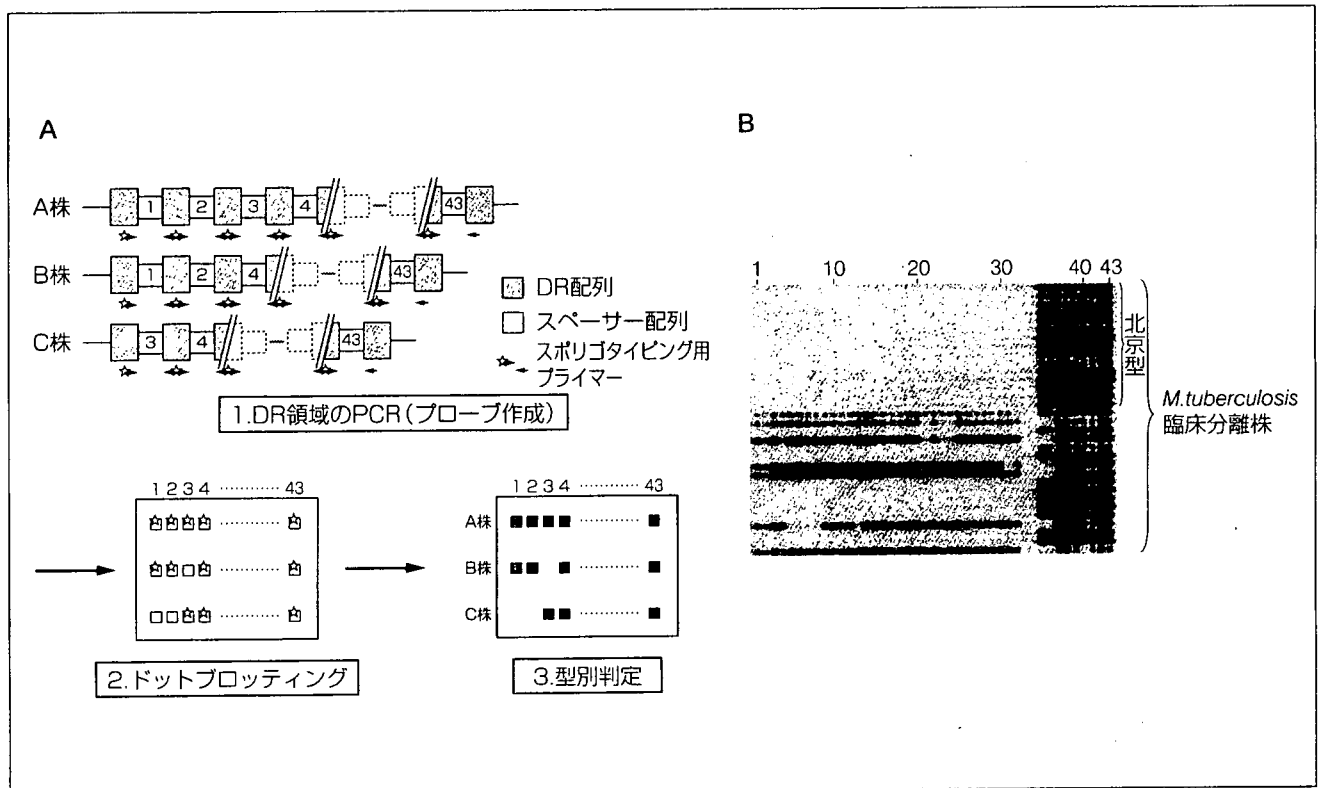


図 2 スポリゴタイピング法

A : 共通する DR 配列に相補的なプライマーを用いて PCR 法で標識プローブを合成する。43 種のオリゴ DNA をあらかじめスポットした膜とプローブとの反応で、スペーサー DNA の有無を調べる。

B : 解析例。日本国内で分離される結核菌の大部分は北京型結核菌である。

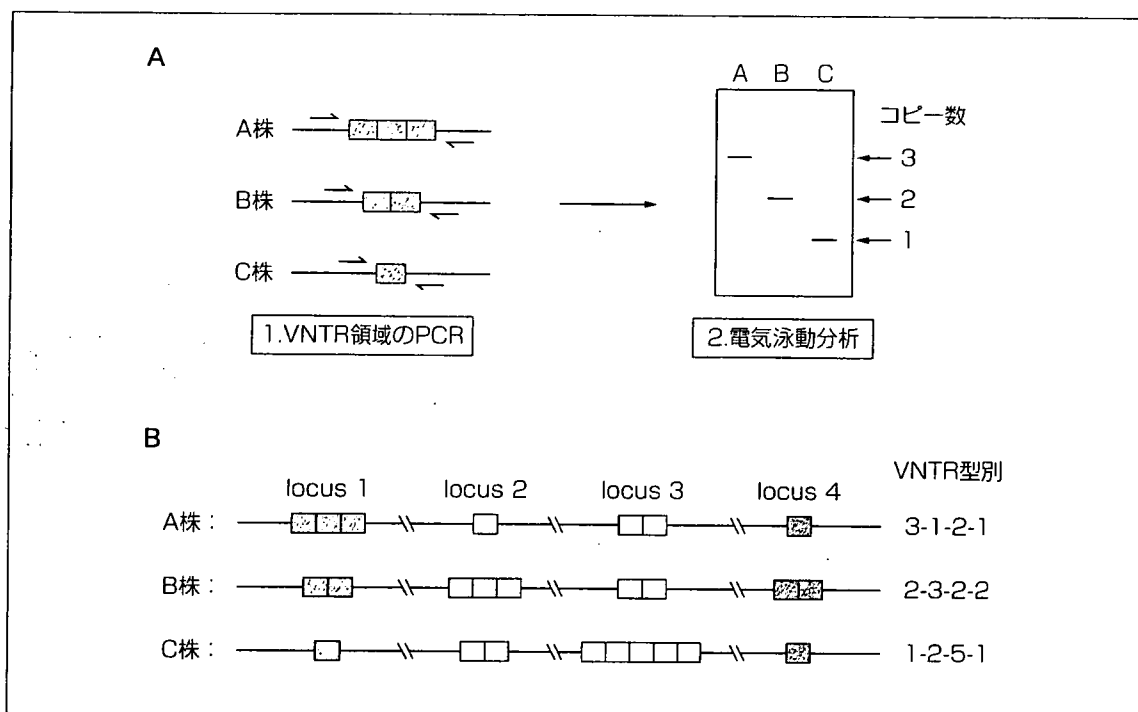


図3 VNTR法

A：ゲノム上のミニサテライト領域をPCR法により増幅し、PCR産物の分子量から繰り返し数を算出する。

B：複数のVNTR領域を個別に解析し、それぞれの繰り返し数を羅列して型別とする。領域の組み合わせにより、目的に応じた型別解析が可能である。

型別の国際的標準法となっている。



スポリゴタイピング法

結核菌ゲノム上に36bpからなるdirect repeat (DR)が存在する領域があり、これらのDRは異なる塩基配列で構成されたスペーサーDNA (37~41bp)を介して連なっている。1~43番目までのスペーサーDNAの有無を、それぞれに相補的なオリゴDNAをスポットした膜を使って、ハイブリダイゼーション法で調べるのがスポリゴタイピング (spoligotyping) 法である (図2)。

RFLP分析法が結果を得るのに4日 (調製済みのDNAから) 必要であるのに対して、スポリゴタイピング法ではポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を利用して分析するため、2日で結果が得られる。

欧米諸国では迅速な型別法として利用されているが、国内の結核菌では分子多様性が低く、型別可能な株の割合が低いという欠点がある。これは、1~34部分が陰性、35~43部分のみが陽性となる

“北京型”株が日本国内の結核菌の約70~80%を占めていることが原因である¹⁾。また、わが国だけでなく中国や韓国でも、北京型結核菌の割合が高いことが報告されている。



反復配列多型分析法

1) 原理とlocus選択の重要性

VNTR分析法は、パスツール研究所で進められた結核菌のゲノムプロジェクトで明らかになったミニサテライトであるmycobacterial interspersed repetitive units (MIRU)などの繰り返し配列のコピー数を調べ、結核菌の型別を行う方法である (図3)。Mycobacterium tuberculosis H37Rv株では41カ所のMIRUが存在し、そのうち12カ所は株間で多様性があり、結核菌の型別に利用できることが報告されている。このVNTR法は、PCR法を利用して核酸を増幅するため、少量の未精製のDNAを検体として使うことができる。そのため、RFLP分析法より迅速に結果を得ることが可能

表 2 代表的な VNTR 解析の領域組み合わせ

VNTR 領域	解析領域数	特徴
MIRU-VNTR	12	もともと汎用される標準的組み合わせ。やや解像度が低い。
ETR (exact tandem repeat)	4	MIRU-VNTR の追加解析として、補助的に用いられることがある。
QUB (Queen's University Belfast)	4~11	非常に多型性に富む領域を含み、北京型結核菌の解析や型別の細分化に適する。
Supply's 15 (24)-locus system	15 (24)	世界各国の分離菌を元に構築された組み合わせであり、グローバルスタンダードとしての用途が期待されている。
JATA (12)-VNTR	12	日本国内の臨床分離株を効率よく解析できる組み合わせ。

で、有用なタイピング方法である。しかし、国内の結核菌分析では、12カ所の MIRU 分析と 4カ所の exact tandem repeat (ETR) の合計 16カ所の VNTR 分析 (表 2) でも、クラスター率では RFLP 分析の分解能に及ばない。

そこで、Queen's University Belfast (QUB) などの、MIRU 以外の locus を適切に選択することや分析 locus 数を増やすことで、RFLP 分析の分解能に近づけるなどの改良が必要である。VNTR 分析の分解能は、調べる locus に依存する。非常に変化しやすい (不安定な) locus を選択すれば、分解能は上がるが家族内感染で同一感染源と考えられる場合でも異なる結核菌と判定される可能性が生じ、逆に変化が生じない (安定な) locus を選択すると、すべて同じ型の結核菌と判定される可能性がある。このように、VNTR 分析では locus の選択が非常に重要である。

2) 欧米諸国での標準分析法

アメリカ疾病予防管理センター (CDC) は、12-locus の MIRU 分析を RFLP 法に代わるタイピング法として採用している。また、Supply らは、ヨーロッパ諸国での結核菌遺伝子型データベース構築を目指して、15-locus VNTR 分析および 24-locus VNTR 分析を標準分析法として提唱している²⁾。この分析法は、通常 15-locus VNTR 法で菌の分析を行い、高い分解能が必要な場合は、さらに 9-lo-

cus を加えた合計 24-locus の分析を行うという型別法である。現在、この 15 (24)-locus VNTR 分析法が、国際的な標準分析法として認知されつつある。

3) 日本国内株の反復配列多型分析

アメリカ CDC が採用している 12カ所の MIRU 分析で日本国内の株を分析すると、約 24% の株が同一プロファイルに分類されるため、直接この方法を国内に適応することはできない。一方、国内株を Supply らの 15-locus で VNTR 分析すると、12-locus MIRU-VNTR より分解能の上昇がみられたが、まだ大きなクラスターが残ると岩本らは報告している³⁾。これは、日本国内の結核菌は、先に述べたように大部分が北京型で、欧米諸国の結核菌と遺伝子型が異なっていることに原因があると考えられる。

財団法人結核予防会 (JATA) 結核研究所は、国内結核菌のタイピングに最適な locus の選択と分析 locus 数の検討を行い、12カ所の分析でヨーロッパの 15-locus VNTR 分析法より分解能が高い、JATA (12)-VNTR 分析法を報告した¹⁾。現在、この国内結核菌の分析に特化した方法で、集団発生事例などの株を用いて解析を進め、RFLP 分析結果との矛盾がないか検討を行っている。